

Polyester synthase gene and process for producing polyester

Patent Number: ☐ [EP0824148](#), [A3](#), [B1](#)
Publication date: 1998-02-18
Inventor(s): TOSHIAKI FUKUI (JP); YOSHIHARU DOI (JP)
Applicant(s): RIKAGAKU KENKYUSHO (JP)
Requested Patent: ☐ [JP10108682](#)
Application Number: EP19970113932 19970813
Priority Number(s): JP19960214509 19960814; JP19970199979 19970725
IPC Classification: C12N15/52; C12N15/60; C12N1/21; C12P7/62; C12N15/74; C12N1/21; C12R1/05
EC Classification: C12N9/00L, C12N9/88, C12P7/62A
Equivalents: ☐ [DE69728096D](#), ☐ [DE69728096T](#), [JP3062459B2](#), ☐ [US5981257](#)
Cited Documents: [WO9505472](#); [WO9302187](#); [WO9100917](#)

Abstract

The present invention relates to a polyester synthase gene coding for a polypeptide containing the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a sequence where in said amino acid sequence, one or more amino acids are deleted, replaced or added, said polypeptide bringing about polyester synthase activity; a gene expression cassette comprising the polyester synthase gene and either of open reading frames located upstream and downstream of said gene; a recombinant vector comprising the gene expression cassette; a transformant transformed with the recombinant vector; and a process for producing polyester by culturing the transformant in a medium and recovering polyester from the resulting culture.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-108682

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月28日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04		C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
9/88		9/88	
C 1 2 P 7/62		C 1 2 P 7/62	
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 25 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-199979	(71) 出願人	000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22) 出願日	平成9年(1997) 7月25日	(72) 発明者	福居 俊昭 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所 内
(31) 優先権主張番号	特願平8-214509	(72) 発明者	土肥 義治 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所 内
(32) 優先日	平8(1996) 8月14日	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 ポリエステル重合酵素遺伝子及びポリエステルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びポリエステルの製造方法の提供。

【解決手段】 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらすポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子、該ポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方を含む遺伝子発現カセット、前記ポリエステル合成酵素遺伝子又は遺伝子発現カセットを含む組換えベクター、該組換えベクターによって形質転換された形質転換体、該形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することとを特徴とするポリエステルの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらしポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子。

【請求項2】 配列番号1で表される塩基配列を含むポリエステル重合酵素遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2記載のポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方を含む遺伝子発現カセット。

【請求項4】 ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号4で表されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項5】 ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号3で表される塩基配列を含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項6】 ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号6で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、エノイル-C₆H₄ヒドラターゼ活性をもたらしポリペプチドをコードするDNAを含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項7】 ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号5で表される塩基配列を含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

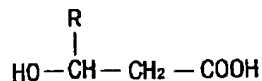
【請求項8】 請求項1若しくは2記載のポリエステル重合酵素遺伝子又は請求項3～7のいずれか1項に記載の遺伝子発現カセットを含む組換えベクター。

【請求項9】 請求項8記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項10】 請求項9記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルの採取することとを特徴とするポリエステルの製造方法。

【請求項11】 ポリエステルが、次式I：

【化1】



(Rは水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアリカン酸の共重合体である請求項10記載のポリエステルの製造方法。

【請求項12】 ポリエステルが、ポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体である請求項10記載のポリエステルの製造

方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及び該形質転換体を用いたポリエステルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】数多くの微生物は、ポリ-3-ヒドロキシブチレート(P(3HB))を生合成し、エネルギーの貯蔵物質として体内に微粒子状で蓄えることが知られている。微生物体内から抽出したP(3HB)は、180℃程度に融解温度をもつ熱可塑性高分子であり、優れた生分解性と生体適合性を示すことから、環境を保全する“グリーン”プラスチックとして注目されている。また、P(3HB)は各種の微生物を用いて糖や植物油などの再生可能炭素資源から合成できる“グリーン”プラスチックである。しかしながら、P(3HB)は、高結晶性高分子のために耐衝撃性が劣るという物性上の問題があり、実用化が見送られてきた。

【0003】近年、3-ヒドロキシブチレート(3HB)と3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との2成分共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)およびその製造法について、研究、開発がなされ、たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP(3HB-co-3HH)共重合体の製造法は、土より単離したアエロモナス・キャビエ(Aeromonas caviae)を用いてオレイン酸やオリーブオイルから発酵生産するものである。発酵生産したP(3HB-co-3HH)共重合体は、3HHユニット分率の増加とともに結晶化度が低下するために、柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れ、強い糸や透明でしなやかなフィルムにも加工できることが明らかにされている(Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, Macromolecules 28, 4822-4823 (1995))。しかしながら、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報に記載の製造方法では、ポリエステルの収率(乾燥微生物体内のポリエステル含有量)が低い。そのため、P(3HB-co-3HH)共重合ポリエステルの高収率で生産する方法の開発が望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターによって形質転換された形質転換体及び該形質転換体を用いたポリエステルの製造方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ポリエステル重合酵素の遺伝子をクローニングし、さらにポリエステル重合酵

素遺伝子に付随する上流及び下流のオープンリーディン

グフレームのいずれか一方又は両方を欠失させることによりポリエステルを高収率で生産することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらすポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子である。該遺伝子としては、例えば配列番号1で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

【0007】さらに、本発明は、前記ポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方を含む遺伝子発現カセットである。該遺伝子発現カセットにおいて、ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームとしては、配列番号4で表されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むもの（例えば配列番号3）が挙げられ、ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームとしては、配列番号6で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、エノイル-C₆Aヒドラーゼ活性をもたらすポリペプチドをコードするDNAを含むもの（例えば配列番号5）が挙げられる。

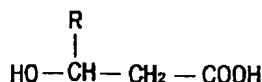
【0008】ここで、本発明のポリエステル重合酵素遺伝子は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じて、当該アミノ酸配列を有するポリペプチドがポリエステル重合活性を有する限り、そのポリペプチドをコードするDNAも本発明の遺伝子に含まれる。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列の第1番目のメチオニンが欠失したものをコードするDNAも、本発明の遺伝子に含まれる。

【0009】さらに、本発明は、前記ポリエステル重合酵素遺伝子又は前記遺伝子発現カセットを含む組換えベクターである。さらに、本発明は、前記組換えベクターによって形質転換された形質転換体である。

【0010】さらに、本発明は、前記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルの採取することを特徴とするポリエステルの製造方法である。ポリエステルとしては、例えば、次式1：

【0011】

【化2】



【0012】（Rは水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。）で示される3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体（例えば、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート）ランダム共重合体）が

挙げられる。以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】

(1) ポリエステル重合酵素遺伝子のクローニング

本発明のポリエステル重合酵素遺伝子は、アエロモナス属に属する微生物の菌体から分離される。まず、ポリエステル重合酵素遺伝子を有する菌株から染色体DNAを調製する。菌株としては、例えばアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) が挙げられる。

10 【0014】染色体DNAの調製は公知の方法を用いることができる。例えば、アエロモナス・キャビエをLB培地で培養した後、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 2.4.3頁, John Wiley & Sons 出版, 1994年) 等により染色体DNAを調製する。

【0015】上記の手法により得られたDNAを適当な制限酵素（例えばSau3A1、BamHI、BglII等）で部分分解した後、アルカリホスファターゼ処理を行い、DNA断片を脱リン酸化する。これを制限酵素（例えばBamHI、BglII等）で切断したベクターとライゲーションを行い、ライブラリーを作成する。

【0016】ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。ファージベクターとしては、例えばEMBL3、ML3、λgt11等が挙げられ、プラスミドベクターとしては、例えばpBR322、pUC18、pBluescript II (STRATAGENE社製) 等が挙げられる。さらに、大腸菌やバチルス・プレビスなどの2種以上の宿主微生物で自律的に増殖可能なベクターのほか、各種のシャトルベクターを使用することもできる。このようなベクターについても、前記制限酵素で切断し、その断片を得ることができる。

【0017】DNA断片とベクター断片とを連結させるには、公知のDNAリガーゼを用いる。そして、DNA断片とベクター断片とをアニーリングさせた後連結させ、組換えベクターを作成する。

【0018】宿主微生物に組換えベクターを導入するには、公知の方法により行うことができる。例えば、宿主微生物が大腸菌の場合はカルシウム法 (Lederberg, E.M. et al., J. Bacteriol. 119, 1072 (1974)) やエレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.4頁, 1994年) を採用することができ、宿主微生物がファージDNAの場合はインビトロ・パッケージング法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 5.7.1頁, 1994年) 等を採用することができる。本発明では、インビトロ・パッケージング用キット (Gigapack II; STRATAGENE 社製等) を用いることもできる。

【0019】次に、アエロモナス・キャビエのポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得るためのプローブを調製する。ポリエステル重合酵素のアミノ酸配列

については、既に何種類かのものが知られている (Peoples, O.P. and Sinsky, A.J., J.Biol.Chem., 264, 15293 (1989); Huisman, G.W. et al., J.Biol.Chem., 266, 2191 (1991); Pieper, U. et al., FEMS Microbiol.Lett., 96, 73(1992)他)。そこで、これらのアミノ酸配列のうち、保存されている2つの領域を選択し、それをコードする核酸塩基配列を推定してオリゴヌクレオチドを設計する。これらオリゴヌクレオチドとしては、例えば5'-CC(C/G)CC(C/G)TGGATCA(T/C)AGT(T/A)(T/C)TAC(T/C)ATC-3' (配列番号7)、及び5'-(G/C)AGCCA(G/C)CC(G/C)GTCCA(A/G)TC(G/C)GCCACCA-3' (配列番号8)で表される2種類のオリゴヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【0020】これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、アエロモナス・キャピエの染色体DNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR; Molecular Cloning, 2巻, 14.2頁, 1989年)を行う。そして、PCRによりポリエステル重合酵素遺伝子を部分的に増幅する。

【0021】次に、この部分増幅断片を適当な試薬を用いて標識し、前記染色体DNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションを行う (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 6.0.3 頁, 1994年)。

【0022】コロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングされた大腸菌からアルカリ法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.6.1頁, 1994年) によってプラスミドを回収することにより、ポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片が得られる。

【0023】上記DNA断片の塩基配列の決定は、公知方法、例えばサンガー法 (Molecular Cloning, 2巻, 13.3頁, 1989年) 等によって行うことができ、塩基配列自動分析装置、例えば373A・DNA シークエンサー (Applied Biosystems社) 等を用いて行うことができる。

【0024】配列番号1に本発明のポリエステル重合酵素遺伝子の塩基配列を、配列番号2に該遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を示すが、当該アミノ酸配列を有するポリペプチドがポリエステル重合活性をもたらす限り、アミノ酸のいくつかについて欠失、置換、付加等の変異があってもよい。また、本発明の遺伝子は、配列番号2で表されるアミノ酸をコードする塩基配列をもつもののほか、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものである。

【0025】なお、上記欠失等の変異は、公知の部位突然変異誘発方法 (Current Protocols in Molecular Biology 1巻, 8.1.1 頁, 1994年) により誘発することができる。上記手法により塩基配列が決定された後は、化学合成によって、又は染色体DNAを鋳型としたPCR法によって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

【0026】(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組み換えベクターを、該組み換えベクターを作製する際に用いた発現ベクターに適合する宿主中に導入することにより得られる。宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、アルカリゲネス属に属する微生物、シュードモナス属に属する微生物、バチルス属に属する微生物等の細菌、サッカロミセス属、カンジダ属等の酵母、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞などが挙げられる。

【0027】アルカリゲネス属に属する微生物、シュードモナス属に属する微生物等の細菌を宿主として用いる場合は、本発明の組換え体DNAが該宿主中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、本発明のDNA、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。発現ベクターとしては、広範囲の宿主において複製・保持されるRK2複製起点を有するpLA2917(ATCC 37355)、あるいはRSF1010複製起点を有するpJRD215(ATCC 37533) 等が挙げられる。

【0028】プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trp プロモーター、lac プロモーター、P_L プロモーター、P_u プロモーター、T7プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。細菌への組み換え体DNAの導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.1頁, 1994年)、エレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.4 頁, 1994年) 等が挙げられる。

【0029】酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えばYEpl3、YCp50等が挙げられる。プロモーターとしては、例えばgal 1 プロモーター、gal 10プロモーター等が挙げられる。酵母への組換え体DNAの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法 (Methods. Enzymol., 194, 182-187(1990))、スフェロプラスト法 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, 1929-1933(1978))、酢酸リチウム法 (J.Bacteriol., 153, 163-168(1983)) 等が挙げられる。

【0030】動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNA1、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社) 等が用いられる。動物細胞への組換え体DNAの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法等が挙げられる。

【0031】ここで、前記のようにして決定された塩基配列は、ポリエステル重合酵素遺伝子のほかに、その上流及び下流にポリエステル合成に関与する遺伝子のオープンリーディングフレームが複数含まれている。すなわち、ポリエステル重合酵素遺伝子は、単一のプロモーター領域の支配下に少なくとも2個のORFとともにオペロンを形成している。

【0032】ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に位置するORFを以下「ORF1」といい、下流に位置するORFを以下「ORF3」という。ORF1は、菌体内ポリエステルの蓄積に関与する遺伝子又はポリエステル生合成系遺伝子のものであると思われる。また、ORF3は、ポリエステル生合成に関与するエノイル-C₆Aヒドラーゼ（特に（R）-特異のエノイル-C₆Aヒドラーゼ）をコードする遺伝子のものであることを明らかにした。

【0033】本発明では、図1に示すように、発現制御領域（図1（1）において「-35/-10」と表示）、ポリエステル重合酵素遺伝子、ORF1及びORF3を含むEcoRI断片をクローニングした（図1（1））。この断片をEE32とする。

【0034】次に、EE32においてORF1又はORF3のいずれか一方又は両方を欠失させた断片（遺伝子発現カセット）を作製し、このカセットを宿主に導入することにより、ポリエステルの効率よく生産することができる形質転換体を得ることができる。

【0035】EE32中、発現制御領域とORF1の翻訳開始領域との間、及びORF1の翻訳停止領域とポリエステル重合酵素遺伝子の翻訳開始領域との間にそれぞれ制限酵素BglII部位を導入し、BglIIによりORF1を欠失させる（図1（2））。これと同様にして、ポリエステル重合酵素遺伝子の翻訳停止領域とORF3との間に制限酵素BamHI領域を挿入し、BamHI処理によりORF3を欠失させる（図1（3））。

【0036】ORF1及びORF3の両者を欠失させるには、EE32について、上記ORF1及びORF3を欠失させる操作を両方行えばよい（図1（4））。なお、制限酵素部位は、合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異の変異法（Curmt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 8.1.1 頁, 1994年）によって導入することができる。

【0037】このようにして得られたそれぞれの遺伝子発現カセットを、前記発現可能なプラスミド（例えばpJRD215（ATCC 37533））に挿入し、得られた組換えベクターを用いて、アルカリゲネス・ユートロファス（*Alcaligenes eutrophus*）・PHB-4株（DSM541）（ポリエステル合成能欠損株）を形質転換する。形質転換法としては、例えば塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、低pH法、インビトロ・パッケージングによる方法、接合伝達法等が挙げられる。

【0038】（3）ポリエステルの製造
ポリエステルの製造は、本発明の形質転換体を培地で培養し、培養菌体又は培養物中に本発明のポリエステルを生成蓄積させ、該培養菌体又は培養物から該ポリエステルを採取することにより行われる。本発明の形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0039】アルカリゲネス属に属する微生物又はシェードモナス属に属する微生物等の細菌を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源を与え、窒素源、無機塩類及び有機栄養源のうちのいずれかを制限した培地、例えば窒素源を0.01～0.1%に制限した培地が挙げられる。

【0040】炭素源は微生物の増殖に必要であり、かつ、ポリエステル合成の原料となるものであり、その例としては、例えばグルコース、フラクトース、スクロース、マルトース等の炭水化物が挙げられる。また、炭素数2以上の油脂関連物質を炭素源とすることもできる。炭素数2以上の油脂関連物質としては、コーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚油又は牛油などの天然油脂、酢酸、プロピオン酸、ブタン酸、ペンタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、リノール酸若しくはミリスチン酸等の脂肪酸又はこれら脂肪酸のエステル、オクタノール、ラウリルアルコール、オレイルアルコール若しくはパルミチルアルコール等又はこれらアルコールのエステル等が挙げられる。

【0041】窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー等が挙げられる。無機物としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

【0042】培養は、通常振盪培養などの好気的条件下、25～37℃で発現誘導後24時間以上（例えば1～7日）行う。培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。そして、培養することによりポリエステルの菌体内に蓄積させ、その後、このポリエステルを回収する。

【0043】誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）、インドールアクリル酸（IAA）等を培地に添加することができる。

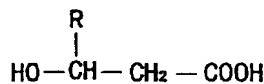
【0044】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えばRPMI-1640、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、30～37℃で14～28日間行う。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0045】本発明において、ポリエステルの精製は例えば以下のように行うことができる。培養液から遠心分離によって形質転換体を集め、蒸留水で洗浄した後、乾燥させる。その後、クロロホルムに乾燥形質転換体を懸

濁し、加熱することによってポリエステルを抽出する。なお、濾過によって残渣を取り除く。このクロロホルム溶液にメタノールを加えてポリエステルの沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去した後、乾燥して精製ポリエステルの得る。

【0046】得られたポリエステルの目的のものであることの確認は、通常の方法、例えばガスクロマトグラフ法、核磁気共鳴法等により行う。本発明の遺伝子はアエロモナス・キャピエから単離したポリエステル重合酵素をコードする遺伝子を含んでいる。この重合酵素は、次式I:

【0047】
【化3】



【0048】(Rは水素原子又は炭素数1~4のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアリカン酸をモノマーユニットとした共重合体(ポリエステル)を合成することが可能である。上記共重合体としては、例えばポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HH))等が挙げられ、前記重合酵素遺伝子を導入した形質転換体はP(3HB-co-3HH)を極めて高効率で生産する能力を示す。

【0049】従来では、ポリ-3-ヒドロキシブチレート(P(3HB))あるいはポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバレート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HV))の製造法について研究、開発がなされたが、これらのポリエステルは高結晶性高分子のために耐衝撃性が劣るという物性上の問題がある。

【0050】炭素数6の3-ヒドロキシヘキサノエートをポリマー鎖に導入することによって結晶化度が低下するため、ポリエステルは柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れるが、アエロモナス・キャピエを用いた従来のP(3HB-co-3HH)製造法(特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報)では、ポリエステルの収率が低い。

【0051】これに対し、本発明ではP(3HB-co-3HH)共重合ポリエステルの高収率で生産することができる。上記手法により目的とするポリエステルの大量に得ることができるため、これを用いて生分解性の糸やフィルム、各種容器等の素材として利用することができる。また、本発明の遺伝子を用いてP(3HB-co-3HH)共重合ポリエステル高生産株を育種することもできる。

【0052】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

【実施例1】アエロモナス・キャピエのポリエステル重

合酵素遺伝子のクローニング

最初に、アエロモナス・キャピエの染色体DNAライブラリーを作製した。

【0053】アエロモナス・キャピエFA440株を10mlのLB培地(1%イーストエキス、0.5%トリプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1%グルコース、pH7.5)中、30°Cで終夜培養した後、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム法(Curmt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 2.4.3.頁, 1994年; John Wiley & Sons 出版)により染色体DNAを得た。

【0054】得られた染色体DNAを制限酵素Sau3AIで部分分解した。またベクタープラスミドについては、コスミドベクターであるpLA2917(ATCC37355)を使用した。このプラスミドを制限酵素BglIIで切断し、脱リン酸化処理(Molecular Cloning, 1巻, 5.7.2 頁, 1989年; Cold Spring Harbor Laboratory 出版)を施した後、DNAリガーゼを用いて染色体DNA部分分解断片と連結させた。

【0055】この連結DNA断片を用いたインビトロ・パッケージング法(Curmt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 5.7.2 頁, 1994年)によって大腸菌S17-1株を形質転換し、アエロモナス・キャピエ染色体DNAライブラリーを得た。

【0056】次に、アエロモナス・キャピエのポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得るためのプローブを調製した。これまでに知られている数種のポリエステル重合酵素のアミノ酸配列でよく保存されている2つの領域を選択し、それをコードする核酸塩基配列を推定して5'-CC(C/G)CC(C/G)TGGATCAA(T/C)AAGT(T/A)(T/C)TA(T/C)ATC-3'(配列番号7)、及び5'-(G/C)AGCCA(G/C)GC(G/C)GTCCA(A/G)TC(G/C)GCCACCA-3'(配列番号8)で表される2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0057】これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、アエロモナス・キャピエの染色体DNAを鋳型としたPCR法によってポリエステル重合酵素遺伝子を部分増幅した。PCRは、94°Cで30秒、50°Cで30秒及び72°Cで60秒の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。この部分増幅断片をDIG DNA 標識キット(ベリンガー・マンハイム社製)によってジゴキシゲニン標識し、プローブとした。

【0058】得られたプローブを用いてアエロモナス・キャピエ染色体DNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーション法によってポリエステル重合酵素遺伝子を含むプラスミドを有する大腸菌を単離した。この大腸菌からアルカリ法によってプラスミドを回収することでポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得た。この断片のBglII-EcoRI断片についてサンガー法によって塩基配列を決定した。その結果、配列番号9又は10で表される3.2kbp断片の塩基配列が決定された。

【0059】さらに、この塩基配列について相同性検索を行った結果、この3.2kbpの塩基配列の中には、配列番号1で表される塩基配列(1785bp)を含むポリエステル重合酵素遺伝子を同定することができた。なお、本発明においては、本発明のポリエステル重合酵素遺伝子によりコードされるタンパク質が、ポリエステル重合の遺伝子発現機能を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。

【0060】また、配列番号9又は10で表される塩基配列を有する断片において、上記1785bpの塩基配列の下流に存在する405bpの遺伝子(ORF3)及び転写終結領域、並びに上流に存在する354bpの遺伝子(ORF1)及び発現調節領域を同定した。ORF1の塩基配列を配列番号3、ORF1によりコードされるアミノ酸配列を配列番号4に、ORF3の塩基配列を配列番号5、ORF3によりコードされるアミノ酸配列を配列番号6に示す。ここで、ORF3はポリエステル合成に関与するエノイル-C o Aヒドラーゼをコードする遺伝子のものである。そして、ORF3によりコードされるアミノ酸を有するポリペプチドがエノイル-C o Aヒドラーゼ活性、特に(R)-特異的なエノイル-C o Aヒドラーゼ活性をもたらす限り、当該アミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。また、配列番号9及び10で表される塩基配列において、発現調節領域は第1~383番目であり、転写終結領域は第3010~3187番目である。

【0061】〔実施例2〕アルカリゲネス・ユートロファス形質転換体の作製

実施例1で同定された発現調節領域、ORF1、ポリエステル重合酵素遺伝子、ORF3及び転写終結領域を含むBglII-EcoRI断片のBglII部位をEcoRIリンカーを用いてEcoRI部位とし、3.2kbpのEcoRI-EcoRI断片(EE32断片)を得た。これをアルカリゲネス属に属する微生物中で発現可能なプラスミドpJRD215(ATCC37533)に挿入し、得られた組換えプラスミドでアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株(DSM541)(ポリエステル合成能欠損株)を接合伝達法によって形質転換した。

【0062】すなわち、まず、この組換えプラスミドを用いて大腸菌517-1株を塩化カルシウム法によって形質転換した。この組換え大腸菌とアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株をLB培地1.5ml中、30℃で終夜培養し、それぞれの培養液0.1mlを混合し、30℃で4時間培養した。この菌体混合液をMBF寒天培地(0.9%リン酸二ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム、0.5%フルクトース、1.5%寒天、0.3mg/mlカナマイシン)に塗布し、30℃で5日間培養した。

【0063】組換え大腸菌中のプラスミドがアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株に伝達されるとカナマイシン耐性を示すことから、MBF寒天培地上で増殖したコロニーはアルカリゲネス・ユートロファス形質転換体

である。この中から1個のコロニーを単離し、アルカリゲネス・ユートロファスAC32株(以下、AC32株と呼ぶ)を得た。なお、AC32株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-15786として寄託されている。

【0064】さらに合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異法(Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 8.1.1頁, 1994年)によってEE32断片中のORF1遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BglII部位を導入し、BglII-BglII断片を欠失させることによってORF1遺伝子が欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC321株と呼ぶ。

【0065】同様に、部位特異的変異法によってEE32断片中のORF3遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BamHI部位を導入し、BamHI-BamHI断片を欠失させることによってORF3遺伝子が欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC323株と呼ぶ。

【0066】同様に、EE32断片中のORF1遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BglII部位を、ORF3遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BamHI部位を導入し、BglII-BglII断片およびBamHI-BamHI断片を欠失させることによってORF1遺伝子およびORF3遺伝子が共に欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC3213株と呼ぶ。

【0067】さらに、EE32断片を鋳型とし、PCR法によってポリエステル重合酵素遺伝子を増幅し、得られた増幅断片を、公知であるアルカリゲネス・ユートロファス由来ポリエステル合成系遺伝子の発現調節領域と転写終結領域との間に挿入した。PCRは、5'-AGTTCGCCCTCGGTGTCGGTGAA-3'(配列番号11)および5'-GGCATATCGGCTCATCGCGCTCCT-3'(配列番号12)をプライマーとして、94℃で30秒、55℃で30秒及び72℃で60秒の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。

【0068】このDNA断片をプラスミドpJRD215に挿入し、得られた組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC29株と呼ぶ。

【0069】〔実施例3〕アルカリゲネス・ユートロファス形質転換体によるポリエステル合成
アルカリゲネス・ユートロファスH16株、PHB-4

株、AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株、AC29株を、それぞれ、95mlのMB培地（0.9%リン酸二ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム）に1mlの1%オクタン酸ナトリウムを加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30℃で培養した。AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株及びAC29株についてはカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。12時間、24時間、36時間及び48時間経過後にそれぞれ1mlの1%オクタン酸ナトリウムを添加しつつ（オクタン酸ナトリウムの総添加量0.5g）、72時間培養した。

【0070】H16株、及びAC3213株については上述のMB培地に1%オリーブ油、パーム油、コーン油、あるいはオレイン酸を加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30℃で72時間培養した。なお、AC3213株を培養する際には、培地にカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。

【0071】H16株、AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株については上述のMB培地に1mlの1%ヘプタン酸ナトリウムを加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30℃で培養した。なお、AC32株、AC321株、AC323株、及びAC3213株*

*を培養する際には、培地にカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。12時間、24時間、36時間及び48時間経過後にそれぞれ1mlの1%ヘプタン酸ナトリウムを添加しつつ（ヘプタン酸ナトリウムの総添加量0.5g）、72時間培養した。

【0072】培養後、遠心分離によって菌体を回収し、蒸留水で洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。乾燥菌体10~30mgに2mlの硫酸-メタノール混液（15:85）と2mlのクロロホルムを添加して密栓し、100℃で140分間加熱することにより、菌体内ポリエステル分解物のメチルエステルを得た。これに1mlの蒸留水を添加して激しく攪拌した。静置して二層に分離させた後、下層の有機層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーによって分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所製GC-14A、キャピラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1（カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4μm）を用いた。温度条件は、初発温度100℃から8℃/分の速度で昇温した。得られた結果を表1、表2、および表3に示す。

【0073】

【表1】

表1 オクタン酸を炭素源としたポリエステル合成

使用菌株	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリエステル含量 (重量%)	ポリエステル組成 3HB (モル%)	3HH
H16	3.00	86	100	0
PHB-4	0.80	0	-	-
AC32	0.99	33	78	23
AC321	2.85	92	87	13
AC323	2.85	92	88	12
AC3213	3.64	96	85	15
AC29	3.20	94	92	8

3HB: 3-ヒドロキシブチレート、3HH: 3-ヒドロキシヘキサノエート

【0074】

※ ※【表2】

表2 植物油またはオレイン酸を炭素源としたポリエステル合成

使用菌株	炭素源	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリエステル含量 (重量%)	ポリエステル組成 3HB (モル%)	3HH
H16	オリーブ油	4.27	79	100	0
	コーン油	3.57	81	100	0
	パーム油	4.13	79	100	0
	オレイン酸	4.06	82	100	0
AC3213	オリーブ油	3.54	76	96	4
	コーン油	3.60	77	95	5
	パーム油	3.58	81	96	4
	オレイン酸	2.22	70	96	4

3HB: 3-ヒドロキシブチレート、3HH: 3-ヒドロキシヘキサノエート

【0075】

【表3】

表3 ヘブタン酸を炭素源としたポリエステル合成

使用菌株	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリエステル含量 (重量%)	ポリエステル組成 3HB 3HV 3HHp (モル%)		
H16	2.50	60	50	50	0
AC32	0.77	7	30	67	5
AC321	1.67	55	46	52	2
AC323	1.27	40	48	45	7
AC3213	2.76	67	44	48	8

3HB : 3-ヒドロキシブチレート、3HV : 3-ヒドロキシバリレート
3HHp : 3-ヒドロキシヘブタノエート

【0076】オクタン酸を炭素源とした場合、表1に示すようにアルカリゲネス・ユートロファス野生株であるH16株ではポリ(3-ヒドロキシブチレート)ホモポリマーを合成する。これはH16株の有するポリエステル重合酵素は炭素数6の3HH(3-ヒドロキシヘキサノエート)を基質としないためである。そのポリエステル合成能欠損株であるPHB-4株では変異処理によってポリエステル重合酵素が欠損しているため、ポリエステルを蓄積しない。PHB-4株にアエロモナス・キャビエ由来のポリエステル重合酵素遺伝子を含むEE32断片を導入したAC32株では3HH(3-ヒドロキシヘキサノエート)分率22モル%のポリ(3-ヒドロキシブチレート-3ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HH))を乾燥菌体重量あたり33重量%蓄積した。

【0077】さらに、AC321株、AC323株、AC3213株では3HH分率12~15モル%のP(3HB-co-3HH)を92~96重量%蓄積し、ORF1遺伝子、ORF3遺伝子、あるいはその両方を欠失させることでポリエステル収率が著しく改善された。

【0078】また、導入したポリエステル重合酵素遺伝子の発現調節領域および転写終結領域をアルカリゲネス・ユートロファス由来のものに置換したAC29株でも、94重量%のP(3HB-co-3HH)を蓄積し、由来の異なる発現調節領域および転写終結領域を使用してもポリエステル収率が著しく改善された。

【0079】最もポリエステル収率の高いAC3213株をオリーブ油、コーン油、パーム油を炭素源として培養したところ、表2に示すように3HH分率4~5モル%のP(3HB-co-3HH)を76~81重量%蓄積した。植物油に最も多く含まれる脂肪酸成分であるオレイン酸を炭素源としても3HH分率4モル%のP(3HB-co-3HH)を70重量%で蓄積した。野生株であるH16株はこの条件下でポリ(3-ヒドロキシブチレート)ホモポリマーのみを合成した。

【0080】なお、アエロモナス・キャビエFA440株では、パルミチン酸を炭素源として8重量%のP(3HB-co-3HH)を蓄積することが報告されている(特開平7-265065号公報)。本発明においてはオクタン酸を炭素源として96重量%のP(3HB-co-3HH)が、また極めて安価である植物油を炭素源として76~81重量%のP(3HB-co-3HH)が蓄積されることから、公報記載の方法と比較すると、本実施例で使用した形質転換体によるP(3HB-co-3HH)合成法は極めて優れた方法であると言える。

【0081】ヘブタン酸を炭素源とした場合、表2に示すようにアルカリゲネス・ユートロファス野生株であるH16株ではポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート)共重合体(P(3HB-co-3HV))を合成する。これはH16株の有するポリエステル重合酵素は炭素数7の3HHp(3-ヒドロキシヘブタノエート)を基質としないためである。PHB-4株にアエロモナス・キャビエ由来のポリエステル重合酵素遺伝子を含むEE32断片を導入したAC32株では3HHp分率5モル%のポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート-3-ヒドロキシヘブタノエート)三元共重合体(P(3HB-co-3HV-co-3HHp))を乾燥菌体重量あたり7重量%蓄積した。

【0082】さらに、AC321株、AC323株、AC3213株では3HHp分率2~8モル%のP(3HB-co-3HV-co-3HHp)を40~67重量%蓄積し、ORF1遺伝子、ORF3遺伝子、あるいはその両方を欠失させることでポリエステル収率が著しく改善された(表3)。

【0083】これらの結果から、アエロモナス・キャビエ由来のポリエステル重合酵素は炭素数4~7の3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする共重合ポリエステルを合成することができると言える。

【0084】〔実施例4〕ORF3の機能同定
EE32断片を鋳型として、PCR法によってORF3遺伝子を増幅し、発現プラスミドPET-3a(ノバジェン社製)のT7プロモーター下流に挿入した。PCRは5'-CCCATATGACCGCACAAATCCCTGGAAGTAG-3'(配列番号13)および5'-CTGGGATCCGCCGCTGCTTAAGGCAGCTTG-3'(配列番号14)をプライマーとして、95℃で60秒、68℃で30秒の反応を1サイクルとして25サイクル行った。得られたプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)株(ノバジェン社製)を形質転換した。得られた形質転換体を以下、NB3株とする。

【0085】NB3株を100mlのLB培地で30℃、4時間培養し、イソプロピルチオガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度0.4 mMとなるように添加して発現を誘導し、さらに30℃で2時間培養した。菌体を遠心分離によ

って回収した後、超音波破碎、遠心分離によって可溶性タンパク画分を得た。表4に示すように、発現プラスミドを導入した菌体の可溶性画分には高いエノイル-CoA

表4 可溶性タンパク画分のエノイル-CoAヒドラターゼ比活性
(ユニット/mgタンパク)

大腸菌BL21(DE3)株/PET-3a	0
大腸菌NB3株	1700

【0087】エノイル-CoAヒドラターゼ活性はクロトニル-CoA(シグマ社製)を基質とし(濃度0.25mM)、2重結合の水和に伴う吸光度変化(263nm)を測定することにより求めた。一方、ORF3遺伝子を挿入していないコントロールプラスミドPET-3aを導入した大腸菌株では活性はまったく検出されなかった。

【0088】そこで、エノイル-CoAヒドラターゼタンパクの精製を行った。NB3株の可溶性タンパク画分をQ-セファロース陰イオン交換カラム(ファルマシア※

表5 エノイル-CoAヒドラターゼ比活性
(ユニット/mgタンパク)

大腸菌NB3株可溶性タンパク画分	1700
陰イオン交換カラム溶出画分	5100

【0090】得られた精製エノイル-CoAヒドラターゼタンパクのN末端アミノ酸配列を決定したところ、表6に示すように開始コドンであるMet以外のアミノ酸配列は、ORF3遺伝子の塩基配列から推定したアミノ酸★

表6 アミノ酸配列の比較

精製エノイル-CoAヒドラターゼ N-末端アミノ酸配列:	SAQSLEVGQKARLSKRFGAA (配列番号15)
ORF3塩基配列から の推定アミノ酸配列:	MSAQSLEVGQKARLSKRFGAA (配列番号16)

【0092】このことから、ORF3がエノイル-CoAヒドラターゼをコードしていることが確認できた。Metは翻訳後修飾によって脱離したものと考えられる。また、ORF3にコードされるエノイル-CoAヒドラターゼの立体特異性について以下のように検討した。

【0093】活性測定の反応溶液に(S)-3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ(シグマ社製)(最終濃度0.2 ユニット/ml)と酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)(最終濃度0.5mM)を添加すると、エノイル-CoAヒドラターゼの特異性が(S)-体特異的であれば、生成した(S)-3-ヒドロキシブチリル-CoAはデヒドロゲナーゼの作用によってアセトアセチル-CoAに酸化される。それ☆

表7 1分後の340nmにおける吸光度変化

エノイル-CoAヒドラターゼ無添加	0.045
ORF3由来エノイル-CoAヒドラターゼ	0.047
(S)-体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ (シグマ社製)	0.146

【0096】この結果から、精製エノイル-CoAヒドラターゼは(R)-体特異的であることが明らかとなった。従って、ORF3は(R)-体特異的エノイル-Co

* Aヒドラターゼ活性が検出された。

【0086】

【表4】

10

※社製)に負荷し、塩化ナトリウム濃度勾配(0Mから1M)によってタンパクを溶出させ、エノイル-CoAヒドラターゼ活性画分を回収した。活性画分のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析から、図2に示すように電気泳動的に均一であることがわかった。また表5に示すように比活性を約3倍に向上させることができた。

【0089】

【表5】

★配列と一致した。

【0091】

【表6】

30☆に伴ってNAD⁺は還元されてNADHが生成し、340nmに特異的な吸収を生じる。逆にエノイル-CoAヒドラターゼが(R)-体特異的であれば、NADHは生成しない。

【0094】表7に示すように、ORF3にコードされるエノイル-CoAヒドラターゼを用いた場合には、340nmの吸光度変化はエノイル-CoAヒドラターゼ無添加の場合とほとんど同じであったが、市販の(S)-特異的エノイル-CoAヒドラターゼ(シグマ社製)を用いた場合には、NADHの生成に伴う吸光度変化が見られた。

【0095】

【表7】

oAヒドラターゼをコードしていることが分かった。

【0097】

【発明の効果】本発明により、ポリエステル重合酵素遺

50

伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びポリエステルの製造方法が提供される。本発明の遺伝子は、炭素数4～7の3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする共重合ポリエステルを合成することが可能なポリエステル重合酵素をコードしている点で、また、本発明の製造方法は、熱安定性や成形性に優れた生分解性プラスチックであるP(3HB-co-3HH)を効率よく合成可能である点で有用である。 *

配列：

ATG ACC CAA CCA TCT TAT GCC CCG CTG TTC GAG GCC CTG GCC CAC TAC	48
Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr	
1 5 10 15	
AAT GAC AAG CTG CTG GCC ATG GCC AAG GCC CAG ACA GAG CGC ACC GCC	96
Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala	
20 25 30	
CAG GCG CTG CTG CAG ACC AAT CTG GAC GAT CTG GCC CAG GTG CTG GAG	144
Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu	
35 40 45	
CAG GCC AGC CAG CAA CCC TGG CAG CTG ATC CAG GCC CAG ATG AAC TGG	192
Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp	
50 55 60	
TGG CAG GAT CAG CTC AAG CTG ATG CAG CAC ACC CTG CTC AAA ACC GCA	240
Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln His Thr Leu Leu Lys Ser Ala	
65 70 75 80	
GCC CAG CCG AGC GAG CCG GTG ATC ACC CCG GAG CCC AGC GAT CGC CGC	288
Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg	
85 90 95	
TTC AAG GCC GAG GCC TGG ACC GAA CAA CCC ATC TAT GAC TAC CTC AAG	336
Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys	
100 105 110	
CAG TCC TAC CTG CTC ACC GCC AGG CAC CTG CTG GCC TCG GTG GAT GCC	384
Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala	
115 120 125	
CTG GAG GCC GTC CCC CAG AAG AGC CCG GAG CCG CTG CGT TTC TTC ACC	432
Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr	
130 135 140	
CGC CAG TAC GTC AAC GCC ATG GCC CCC AGC AAC TTC CTG GCC ACC AAC	480
Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn	
145 150 155 160	
CCC GAG CTG CTC AAG CTG ACC CTG GAG TCC GAC GCC CAG AAC CTG GTG	528
Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val	
165 170 175	
CCC GGA CTG GCC CTC TTG GCC GAG GAT CTG GAG CGC AGC GCC GAT CAG	576
Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln	
180 185 190	
CTC AAC ATC CGC CTG ACC GAC GAA TCC GCC TTC GAG CTC GCG CGG GAT	624
Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp	
195 200 205	
CTG GCC CTG ACC CCG GCC CCG GTG GTG CAG CGC ACC GAG CTC TAT GAG	672
Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu	

*【0098】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1785

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

21	22
210	215
CTC ATT CAG TAC AGC CCG ACT ACC GAG ACG GTG GGC AAG ACA CCT GTG	720
Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu Thr Val Gly Lys Thr Pro Val	
225	230
CTG ATA GTG CCG CCC TTC ATC AAC AAG TAC TAC ATC ATG GAC ATG CCG	768
Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg	
245	250
CCC CAG AAC TCC CTG GTC GCC TGG CTG GTC GCC CAG GGC CAG ACG GTA	816
Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu Val Ala Gln Gly Gln Thr Val	
260	265
TTC ATG ATC TCC TGG CCG AAC CCG GGC GTG GCC CAG GCC CAA ATC GAT	864
Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp	
275	280
CTC GAC GAC TAC GTG GTG GAT GGC GTC ATC GCC GCC CTG GAC GGC GTG	912
Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val	
290	295
GAG GCG GCC ACC GGC GAG CCG GAG GTG CAC GCC ATC GCG TAC TGC ATC	960
Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile	
305	310
GGC GGC ACC GCC CTG TCG CTC GCC ATG GGC TGG CTG GCG GCG CCG CCG	1008
Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg	
325	330
CAG AAG CAG CCG GTG CCG ACC GCC ACC CTG TTC ACT ACC CTG CTG GAC	1056
Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp	
340	345
TTC TCC CAG CCC GGG GAG CTT GGC ATC TTC ATC CAC GAG CCC ATC ATA	1104
Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile Phe Ile His Glu Pro Ile Ile	
355	360
CGC GCG CTC GAG CCG CAA AAT GAG GCC AAG GGC ATC ATG GAC GGC CCG	1152
Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg	
370	375
CAG CTG GCG GTC TCC TTC AGC CTG CTG CCG GAG AAC AGC CTC TAC TGG	1200
Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp	
385	390
AAC TAC TAC ATC GAC AGC TAC CTC AAG GGT CAG AGC CCG GTG GCC TTC	1248
Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe	
405	410
GAT CTG CTG CAC TGG AAC ACC GAC AGC ACC AAT GTG GCG GGC AAG ACC	1296
Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr	
420	425
CAC AAC AGC CTG CTG CCG CGT CTC TAC CTG GAG AAC CAG CTG GTG AAG	1344
His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys	
435	440
GGG GAG CTC AAG ATC CCG AAC ACC CCG ATC GAT CTC GGC AAG GTG AAG	1392
Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys	
450	455
ACC CCT GTG CTG CTG GTG TCG GCG GTG GAC GAT CAC ATC GCC CTC TGG	1440
Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val Asp Asp His Ile Ala Leu Trp	
465	470
CAG GCG ACC TGG CAG GCG ATG AAG CTG TTT GCG GCG GAG CAG CCG TTC	1488

23	Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe	24
	485 490 495	
	CTC CTG GCG GAG TCC GGC CAC ATC GCC GCG ATC ATC AAC CCG CCG GCC	1536
	Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala	
	500 505 510	
	GCC AAC AAG TAC GGC TTC TCG CAC AAC GCG GCC GAG GCC GAG AGC CCG	1584
	Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro	
	515 520 525	
	GAG AGC TGG CTG GCA GCG GCG ACG CAC CAG GCC GCC TCC TGG TGG CCC	1632
	Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro	
	530 535 540	
	GAG ATG ATG GCG TTT ATC CAG AAC CGT GAC GAA GCG TCA GAG CCC GTC	1680
	Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val	
	545 550 555 560	
	CCC GCG GCG GTC CCG GAG GAA GCG CTG GCC CCC GCC CCC GCG CAC TAT	1728
	Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr	
	565 570 575	
	GTC AAG GTG CCG CTC AAC CCC GTG TTT GCC TGC CCA ACA GAG GAG GAC	1776
	Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp	
	580 585 590	
	CCC GCA TGA	1785
	Ala Ala	

【0099】配列番号：2

配列の長さ：594

配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

*

配列：

Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr	
1 5 10 15	
Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala	
20 25 30	
Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu	
35 40 45	
Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp	
50 55 60	
Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln His Thr Leu Leu Lys Ser Ala	
65 70 75 80	
Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg	
85 90 95	
Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys	
100 105 110	
Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala	
115 120 125	
Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr	
130 135 140	
Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn	
145 150 155 160	
Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val	
165 170 175	
Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln	
180 185 190	

25

26

Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp
 195 200 205
 Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu
 210 215 220
 Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu Thr Val Gly Lys Thr Pro Val
 225 230 235 240
 Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg
 245 250 255
 Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu Val Ala Gln Gly Gln Thr Val
 260 265 270
 Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp
 275 280 285
 Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile
 305 310 315 320
 Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg
 325 330 335
 Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp
 340 345 350
 Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile Phe Ile His Glu Pro Ile Ile
 355 360 365
 Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg
 370 375 380
 Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp
 385 390 395 400
 Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe
 405 410 415
 Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr
 420 425 430
 His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys
 435 440 445
 Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys
 450 455 460
 Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val Asp Asp His Ile Ala Leu Trp
 465 470 475 480
 Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe
 485 490 495
 Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala
 500 505 510
 Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro
 515 520 525
 Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro
 530 535 540
 Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val
 545 550 555 560
 Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr
 565 570 575
 Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp
 580 585 590

27

Ala Ala

【0100】配列番号: 3

配列の長さ: 354

配列の型: 核酸

* 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: genomic DNA

配列:

```

ATG ATG AAT ATG GAC GTG ATC AAG AGC TTT ACC GAG CAG ATG CAA GCC      48
Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly
  1           5           10          15
TTC GCC GCC CCC CTC ACC CGC TAC AAC CAG CTG CTG GCC AGC AAC ATC      96
Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn
Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile
                20                25
                30
GAA CAG CTG ACC CGG TTG CAG CTG GCC
TCC GCC AAC GCC TAC GCC GAA      144
Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala
Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu
                35                40
                45
CTG GGC CTC AAC CAG TTG CAG GCC GTG
AGC AAG GTG CAG GAC ACC CAG      192
Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val
Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln
                50                55
                60
AGC CTG GCG GCC CTG GGC ACA GTG CAA
CTG GAG ACC GCC AGC CAG CTC      240
Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln
Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu
                65                70
                75                80
TCC CGC CAG ATG CTG GAT GAC ATC CAG
AAG CTG AGC GCC CTC GGC CAG      288
Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln
Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln
                85
                90                95
CAG TTC AAG GAA GAG CTG GAT GTC CTG
ACC GCA GAC GGC ATC AAG AAA      336
Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu
Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys
                100                105
                110
AGC ACG GGC AAG GCC TGA
                354
Ser Thr Gly Lys Ala
                115

```

【0101】配列番号: 4

配列の長さ: 117

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

29

配列:

```

Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser
Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly
  1                               5
    10                               15
Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn
Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile
              20                               25

              30
Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala
Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu
              35                               40

              45
Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val
Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln
              50                               55

              60
Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln
Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu
              65                               70

              75                               80
Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln
Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln
              85

              90                               95
Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu
Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys
              100                               105

              110
Ser Thr Gly Lys Ala
              115

```

【0102】配列番号:5

配列の長さ:405

配列の型:核酸

*鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

*配列の種類:genomic DNA

配列:

```

ATG AGC GCA CAA TCC CTG GAA GTA GGC
CAG AAG GCC CGT CTC AGC AAG      48
Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly
Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys
  1                               5
    10                               15
CGG TTC GGG GCG GCG GAG GTA GCC GCC
TTC GCC GCG CTC TCG GAG GAC      96
Arg Phe Gly Ala Ala Glu Val Ala Ala
Phe Ala Ala Leu Ser Glu Asp
              20                               25

              30
TTC AAC CCC CTG CAC CTG GAC CCG GCC
TTC GCC GCC ACC ACG GCG TTC      144
Phe Asn Pro Leu His Leu Asp Pro Ala

```

31		32	
Phe	Ala	Ala	Thr
35		40	
45			
GAG	CGG	CCC	ATA
CTC	GCC	AGC	CTC
Glu	Arg	Pro	Ile
Leu	Ala	Ser	Leu
50		55	
60			
CTG	CTG	GGC	CAG
GGG	AGC	ATC	TAT
Leu	Leu	Gly	Gln
Gly	Ser	Ile	Tyr
65		70	
75		80	
AGC	CTC	AGC	TTC
GTC	GGG	GAC	GAG
Ser	Leu	Ser	Phe
Val	Gly	Asp	Glu
90		95	
GAG	GTG	GAG	GTG
GAC	AAG	CCC	ATC
Glu	Val	Glu	Val
Asp	Lys	Pro	Ile
100		105	
110			
ACC	ACC	CGC	ATC
GCC	CTC	GCC	GTG
Thr	Thr	Arg	Ile
Ala	Leu	Ala	Val
115		120	
125			
GCC	GTG	GTC	AAG
130		405	
Ala	Val	Val	Lys

【0103】配列番号: 6

配列の長さ: 134

配列の型: アミノ酸

*トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

*40

配列:

Met	Ser	Ala	Gln	Ser	Leu	Glu	Val	Gly
Gln	Lys	Ala	Arg	Leu	Ser	Lys		
1		5						
10		15						
Arg	Phe	Gly	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Ala
Phe	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Asp		
20		25						
30								
Phe	Asn	Pro	Leu	His	Leu	Asp	Pro	Ala

33
Phe Ala Ala Thr Thr Ala Phe
35 40
45
Glu Arg Pro Ile Val His Gly Met Leu
Leu Ala Ser Leu Phe Ser Gly
50 55
60
Leu Leu Gly Gln Gln Leu Pro Gly Lys
Gly Ser Ile Tyr Leu Gly Gln
65 70
75 80
Ser Leu Ser Phe Lys Leu Pro Val Phe
Val Gly Asp Glu Val Thr Ala
85
90 95
Glu Val Glu Val Thr Ala Leu Arg Glu
Asp Lys Pro Ile Ala Thr Leu
100 105
110
Thr Thr Arg Ile Phe Thr Gln Gly Gly
Ala Leu Ala Val Thr Gly Glu
115 120
125
Ala Val Val Lys Leu Pro
130

【0104】配列番号：7

配列の長さ：27

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCSCCSTGGA TCAAYAAGTW YTAYATC

27

【0105】配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

SAGCCASGCS GTCCARTCSG GCCACCA

27

【0106】配列番号：9

配列の長さ：3187

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

★ 配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：384..734

特徴を表す記号：CDS

40 存在位置：830..2611

★

配列：

AGATCTGGAC CGGGTGCTG GCCTGGGCCA CGCCGGCGAG GCCCAGCCGG GAGCAACCGA 60
GCAGCAGGGC GAGAGGTTTC ATCGGGATTC CTTGGCAGTC TGAATGACGT GCCAGCCTAT 120
CAGCGCGCGC CCGGTGCGGC GAGGGCGCGC CGGACCCAGT GCGTCACCTC TCGTCTGATC 180
CCCTCCCTC GACGGCGCTC GCTGACAAAA AAATTCAAAC AGAAATTAAC ATTTATGTCA 240
TTTACACCAA ACCGCATTG GTTCAGAAAT GCTCAAACGT GTGTTTGAAC AGAGCAAGCA 300
ACACGTAAAC AGGGATGACA TGCAGTACCC GTAAGAAGGG CCGATTGGCC CACAACAACA 360
CTGTTCTGCC GAACTGGAGA CCG ATG ATG AAT ATG GAC GTG ATC AAG AGC 410

Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser

35

36

	1	5	
TTT ACC GAG CAG ATG CAA GCC TTC GCC GCC CCC CTC ACC CGC TAC AAC	458		
Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn			
10 15 20 25			
CAG CTG CTG GCC AGC AAC ATC GAA CAG CTG ACC CGG TTG CAG CTG GCC	506		
Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala			
30 35 40			
TCC GCC AAC GCC TAC GCC GAA CTG GCC CTC AAC CAG TTG CAG GCC GTG	554		
Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val			
45 50 55			
AGC AAG GTG CAG GAC ACC CAG AGC CTG GCC GCC CTG GCC ACA GTG CAA	602		
Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln			
60 65 70			
CTG CAG ACC GCC AGC CAG CTC TCC CGC CAG ATG CTG GAT GAC ATC CAG	650		
Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln			
75 80 85			
AAG CTG AGC GCC CTC GCC CAG CAG TTC AAG GAA GAG CTG GAT GTC CTG	698		
Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu			
90 95 100 105			
ACC GCA GAC GCC ATC AAG AAA AGC ACG GCC AAG GCC TGATAACCCC	744		
Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys Ser Thr Gly Lys Ala			
110 115			
TGGCTGCCCG TTCGGGCAGC CACATCTCCC CATGACTCGA CGCTACGGGC TAGTTCCCGC	804		
CTCGGGTGTG GGTGAAGGAG AGCAC ATG AGC CAA CCA TCT TAT GCC CCG CTG	856		
Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu			
1 5			
TTC GAG GCC CTG GCC CAC TAC AAT GAC AAG CTG CTG GCC ATG GCC AAG	904		
Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys			
10 15 20 25			
CCC CAG ACA GAG CGC ACC GCC CAG CCG CTG CTG CAG ACC AAT CTG GAC	952		
Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp			
30 35 40			
GAT CTG GCC CAG GTG CTG GAG CAG GCC AGC CAG CAA CCC TGG CAG CTG	1000		
Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu			
45 50 55			
ATC CAG GCC CAG ATG AAC TGG TGG CAG GAT CAG CTC AAG CTG ATG CAG	1048		
Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln			
60 65 70			
CAC ACC CTG CTC AAA AGC GCA GCC CAG CCG AGC GAG CCG GTG ATC ACC	1096		
His Thr Leu Leu Lys Ser Ala Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr			
75 80 85			
CCG GAG CGC AGC GAT CGC CGC TTC AAG GCC CAG GCC TGG AGC GAA CAA	1144		
Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln			
90 95 100 105			
CCC ATC TAT GAC TAC CTC AAG CAG TCC TAC CTG CTC ACC GCC AGC CAC	1192		
Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His			
110 115 120			
CTG CTG GCC TCG GTG GAT GCC CTG GAG GCC GTC CCC CAG AAG AGC CCG	1240		
Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg			
125 130 135			

37		38
GAG CCG CTG CGT TTC TTC ACC CGC CAG TAC GTC AAC GCC ATG GCC CCC	1288	
Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro		
140 145 150		
AGC AAC TTC CTG GCC ACC AAC CCC GAG CTG CTC AAG CTG ACC CTG GAG	1336	
Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu		
155 160 165		
TCC GAC GCC CAG AAC CTG GTG CGC GGA CTG GCC CTC TTG GCC GAG GAT	1384	
Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp		
170 175 180 185		
CTG GAG CGC AGC GCC GAT CAG CTC AAC ATC CGC CTG ACC GAC GAA TCC	1432	
Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser		
190 195 200		
GCC TTC GAG CTC GCG CGG GAT CTG GCC CTG ACC CCG GGC CGG GTG GTG	1480	
Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val		
205 210 215		
CAG CGC ACC GAG CTC TAT GAG CTC ATT CAG TAC ACC CCG ACT ACC GAG	1528	
Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu		
220 225 230		
ACG GTG GGC AAG ACA CCT GTG CTG ATA GTG CCG CCC TTC ATC AAC AAG	1576	
Thr Val Gly Lys Thr Pro Val Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys		
235 240 245		
TAC TAC ATC ATG GAC ATG CCG CCC CAG AAC TCC CTG GTC GCC TGG CTG	1624	
Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu		
250 255 260 265		
GTC GCC CAG GGC CAG ACG GTA TTC ATG ATC TCC TGG CGC AAC CCG GGC	1672	
Val Ala Gln Gly Gln Thr Val Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly		
270 275 280		
GTG GCC CAG GCC CAA ATC GAT CTC GAC GAC TAC GTG GTG GAT GGC GTC	1720	
Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val		
285 290 295		
ATC GCC GCC CTG GAC GGC GTG GAG GCG GCC ACC GGC GAG CGG GAG GTG	1768	
Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val		
300 305 310		
CAC GGC ATC GGC TAC TGC ATC GGC GGC ACC GCC CTG TCG CTC GCC ATG	1816	
His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met		
315 320 325		
GGC TGG CTG GCG GCG CGG CGC CAG AAG CAG CCG GTG CCG ACC GCC ACC	1864	
Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr		
330 335 340 345		
CTG TTC ACT ACC CTG CTG GAC TTC TCC CAG CCC GCG GAG CTT GGC ATC	1912	
Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile		
350 355 360		
TTC ATC CAC GAG CCC ATC ATA GCG GCG CTC GAG GCG CAA AAT GAG GCC	1960	
Phe Ile His Glu Pro Ile Ile Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala		
365 370 375		
AAG GGC ATC ATG GAC GCG GCG CAG CTG GCG GTC TCC TTC AGC CTG CTG	2008	
Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu		
380 385 390		
CGG GAG AAC AGC CTC TAC TGG AAC TAC TAC ATC GAC AGC TAC CTC AAG	2056	
Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys		

39 400 405 40

395 410 415 420 425

GGT CAG AGC CCG GTG GCC TTC GAT CTG CTG CAC TCG AAC AGC GAC AGC 2104
Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser

430 435 440

ACC AAT GTG GCG GGC AAG ACC CAC AAC AGC CTG CTG CCG CGT CTC TAC 2152
Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr

445 450 455

CTG GAG AAC CAG CTG GTG AAG GGG GAG CTC AAG ATC CCG AAC ACC CCG 2200
Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg

460 465 470

ATC GAT CTC GGC AAG GTG AAG ACC CCT GTG CTG CTG GTG TCG GCG GTG 2248
Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val

475 480 485

GAC GAT CAC ATC GCC CTC TCG CAG GGC ACC TGG CAG GGC ATG AAG CTG 2296
Asp Asp His Ile Ala Leu Trp Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu

490 495 500 505

TTT GCG GGG GAG CAG CCG TTC CTC CTG GCG GAG TCC GGC CAC ATC GCC 2344
Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala

510 515 520

GCC ATC ATC AAC CCG CCG GCC GCC AAC AAG TAC GCG TTC TGG CAC AAC 2392
Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn

525 530 535

GGG GCC GAG GCC GAG AGC CCG GAG AGC TGG CTG GCA GCG GCG ACG CAC 2440
Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His

540 545 550

CAG GCG GCG TCC TGG TGG CCC GAG ATG ATG GCG TTT ATC CAG AAC CGT 2488
Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg

555 560 565

GAC GAA GGG TCA GAG CCC GTC CCC GCG CCG GTC CCG GAG GAA GGG CTG 2536
Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu

570 575 580 585

CCC CCC GCC CCC GGC CAC TAT GTC AAG GTG CCG CTC AAC CCC GTG TTT 2584
Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe

590

GCC TGC CCA ACA GAG GAG GAC GCC GCA TGAGCGCACA ATCCCTGGAA 2631
Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp Ala Ala

GTAGGCCAGA AGGCCCCGTCT CAGCAAGCGG TTCGGGGCGG CCGAGGTAGC CGCCTTCGCC 2691
CCGCTCTCGG AGGACTTCAA CCCCTGCAC CTGGACCCGG CCTTCGCCGC CACCACGGCG 2751
TTCGAGCGGC CCATAGTCCA CGGCATGCTG CTCGCCAGCC TCTTCTCCGG GCTGCTGGGC 2811
CAGCAGTTGC CCGGCAAGGG GAGCATCTAT CTGGTCAAA GCCTCAGCTT CAAGCTGCCG 2871
GTCTTTGTGC GGGACGAGGT GACGGCCGAG GTGAGGTGA CCGCCCTTCG CGAGGACAAG 2931
CCCATCGCCA CCCTGACCAC CCGCATCTTC ACCCAAGGCG CGGCCCTCGC CGTGACCGGG 2991
GAAGCCGTGG TCAAGCTGCC TTAAGCACCG GCGGCACCCA GGCACAATCA CCCCCGCCCC 3051
TGCGGGGCTG ATTGTTCTCC CCCGCTCCGC TTGCCCCCTT TTTCGGGGCA ATTTGCCCA 3111
GGCCCTTTCC CTGCCCCGCC TAACTGCCTA AAATGCCCGC CCTGCCGTGT AGGCATTGAT 3171
CCAGCTAGAG GAATTC 3187

【0107】配列番号：10

配列の長さ：3187

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：genomic DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

* 存在位置：2611..3012

*

配列：

AGATCTGGAC CGGGGTGCTG GCCTGGGCCA CGCCGGCGAG GGCAGCGCG GAGCAACCGA 60
 CCAGCAGGGC GAGAGCTTTC ATCGGATTC CTTGGCAGTC TGAATGACGT GCCAGCCTAT 120
 CAGCGCGCGC CCGGTGCGGC GAGGGCGCGC CGGACCCAGT GCGTCACCTC TCGTCTGATC 180
 CGCCTCCCTC GACGGCGGTC GCTGACAAAA AAATTCAAAC AGAAATTAAC ATTTATGTCA 240
 TTTACACCAA ACCGCATTTG GTTGCAGAAT GCTCAAACGT GTGTTTGAAC AGAGCAAGCA 300
 ACACGTAAC AGGGATGACA TGCAGTACCC GTAAGAAGGG CCGATTGCCC CACAACAACA 360
 CTGTTCTGCC GAACTGGAGA CCGATGATGA ATATGGAGT GATCAAGAGC TTTACCGAGC 420
 AGATGCAAGG CTTCGCCGCC CCCCTCACCC GCTACAACCA GCTGCTGGCC AGCAACATCG 480
 AACAGCTGAC CCGTTGACG CTGGCTCCG CCAACGCCA CGCCGAACTG GGCCTCAACC 540
 AGTTGCAGGC CGTGAGCAAG GTGCAGGACA CCCAGAGCCT GCGGGCCCTG GGCACAGTGC 600
 AACTGGAGAC CGCCAGCCAG CTCTCCCGCC AGATGCTGGA TGACATCCAG AAGCTGAGCG 660
 CCCTCGGCCA GCAGTTCAAG GAAGAGCTGG ATGTCCTGAC CGCAGACGGC ATCAAGAAAA 720
 GCACGGGCAA GGCCTGATAA CCCCTGGCTG CCGTTCCGG CAGCCACATC TCCCCTATGAC 780
 TCGACCTAC GGGCTAGTTC CCGCTCGGG TGTGGGTGAA GGAGAGCACA TGAGCCAACC 840
 ATCTTATGCC CCGCTGTTG AGGCCCTGG CCACTACAAT GACAAGCTGC TGGCCATGGC 900
 CAAGGCCAG ACAGAGCGCA CCGCCAGGC GCTGCTGCAG ACCAATCTGG ACGATCTGG 960
 CCAGTGCTG GAGCAGGGCA GCCAGCAACC CTGGCAGCTG ATCCAGGCC AGATGAACTG 1020
 GTGGCAGAT CAGCTCAAGC TGATGCAGCA CACCCTGCT AAAAGCCAG CCCAGCCGAG 1080
 CGAGCCGGT ATCAGCCCG AGCCAGCGA TCCCCGCTC AAGGCCGAG CCTGGAGCGA 1140
 ACAACCCATC TATGACTACC TCAAGCAGTC CTACCTGCT ACCGCCAGC ACCTGCTGGC 1200
 CTCGGTGAT GGCCTGGAG GCGTCCCCA GAAGAGCCG GAGCGGCTGC GTTCTTTCAC 1260
 CCGCCAGTAC GTCAAGCCA TGGCCCCAG CAACTTCTG GCCACCAACC CCGAGCTGCT 1320
 CAAGCTGACC CTGGAGTCCG ACGCCAGAA CCTGGTGGC GGAATGCCCC TCTTGCCCGA 1380
 GGATCTGGAG CGCAGCGCCG ATCAGCTCAA CATCCGCTG ACCGACGAAT CCGCCTTCGA 1440
 GCTCGGCGCG GATCTGGCCC TGACCCCGG CCGGTGGTG CAGCGCACCG AGCTCTATGA 1500
 GCTATTGAG TACAGCCGA CTACCGAGC GGTGGGCAAG ACACCTGTGC TGATAGTGC 1560
 CCCCCTCATC AACAAGTACT ACATCATGA CATGCGGCC CAGAACTCC TGGTCCCTG 1620
 GCTGGTCCC CAGGCCAGA CCGTATTCAT GATCTCTGG CGCAACCCG CCGTGGCCA 1680
 GGCCTAAATC GATCTGACG ACTACGTGT GGATGGGTC ATCGCCGCC TGGACGGCGT 1740
 GGAGGGGCC ACCGGCAGC GGGAGGTGA CGCATCGC TACTGCATCG CCGGCACCGC 1800
 CCTGTGCTC GCCATGGGT GCGTGGCGC GCGCGCCAG AAGCAGCGG TCGCACCGC 1860
 CACCCTGTC ACTACCTGC TGGACTTTC CCAGCCCGG GAGCTTGGCA TCTTCATCA 1920
 CGAGCCATC ATAGCGGCG TCGAGGCGA AAATGAGGC AAGGGCATCA TGGACGGCG 1980
 CCAGCTGGG GTCTCTTCA GCCTGCTGG GGAGAACAGC CTCTACTGGA ACTACTACAT 2040
 CGACAGCTAC CTCAGGGTC AGAGCCCGT GGCCTTCGAT CTGCTGCACT CGAACAGCGA 2100
 CAGCACCAAT TGGCGGCA AGACCCACAA CAGCTGCTG CCGCTCTCT ACCTGGAGAA 2160
 CCAGCTGGT AAGGGGAGC TCAAGATCG CAACACCCG ATCGATCTCG CCAAGGTGAA 2220
 GACCCCTGT CTGCTGGTG CCGCGGTGA CGATCACAT CCGCTCTGG AGGGCACCTG 2280
 GCAGGCGATG AAGCTGTTG CCGGGGAGA GCGTTCCTC CTGGCGAGT CCGGCCACAT 2340
 CCGCGGCATC ATCAACCCG CCGCGGCAA CAAGTACCG TTCTGGACA ACGGGCCGA 2400
 GCGCGAGAG CCGGAGAGT GCGTGGCAG GCGACGCAC CAGGGCGCT CCTGGTGGC 2460
 CGAGATGAT GCGTTTATCC AGAACCGTA CGAAGGTCA GAGCCCGTCC CCGCGGGGT 2520
 CCGGAGGAA GCGCTGGCC CCGCCCCG CCACTATGTC AAGGTGGCG TCAACCCGT 2580
 GTTTCCTGC CCAACAGAG AGGACGCCG ATG AGC GCA CAA TCC CTG GAA GTA 2634

Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val

1

5

GCC CAG AAG GCC CGT CTC ACC AAG CGG TTC GCG GCG GAG GTA GCC 2682

43 44

Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys Arg Phe Gly Ala Ala Glu Val Ala

10 15 20

CCC TTC GCC GCG CTC TCG GAG GAC TTC AAC CCC CTG CAC CTG GAC CCG 2730

Ala Phe Ala Ala Leu Ser Glu Asp Phe Asn Pro Leu His Leu Asp Pro

25 30 35 40

CCC TTC GCC GCC ACC ACG GCG TTC GAG CCG CCC ATA GTC CAC GGC ATG 2778

Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Phe Glu Arg Pro Ile Val His Gly Met

45 50 55

CTG CTC GCC AGC CTC TTC TCC GGG CTG CTG GGC CAG CAG TTG CCG GGC 2826

Leu Leu Ala Ser Leu Phe Ser Gly Leu Leu Gly Gln Gln Leu Pro Gly

60 65 70

AAG GGG AGC ATC TAT CTG GGT CAA AGC CTC AGC TTC AAG CTG CCG GTC 2874

Lys Gly Ser Ile Tyr Leu Gly Gln Ser Leu Ser Phe Lys Leu Pro Val

75 80 85

TTT GTC GGG GAC GAG GTG ACG GCC GAG GTG GAG GTG ACC GCC CTT CCG 2922

Phe Val Gly Asp Glu Val Thr Ala Glu Val Glu Val Thr Ala Leu Arg

90 95 100

GAG GAC AAG CCC ATC GCC ACC CTG ACC ACC CCG ATC TTC ACC CAA GGC 2970

Glu Asp Lys Pro Ile Ala Thr Leu Thr Thr Arg Ile Phe Thr Gln Gly

105 110 115 120

GGC GCC CTC GCC GTG ACG GGG GAA GCC GTG GTC AAG CTG CCT 3012

Gly Ala Leu Ala Val Thr Gly Glu Ala Val Val Lys Leu Pro

125 130

TAAGCACCGG CGGCACGCAG GCACAATCAG CCGCGCCCT GCGGGCTGA TTGTTCTCCC 3072

CCGCTCCGCT TGCCCCCTTT TTCGGGCAAA TTGGCCAG GCCCTTCCC TGCCCCGCT 3132

AACTGCCTAA AATGCCCGCC CTGCCGTGTA GGCATTATC CAGCTAGAGG AATTC 3187

【0108】配列番号：11

配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列：

AGTTCCCGCC TCGGTGTGG GTGAA

25

【0109】配列番号：12

配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列：

GCCATATCGC CTCATCGGC GTCCT

25

【0110】配列番号：13

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

GCCATATGAG CGCACAATCC CTGGAAGTAG

30

【0111】配列番号：14

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CTGGATCCG CCGTGCTTA AGGCAGCTTG

30

【0112】配列番号：15

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

配列：

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：他の核酸（合成DNA）

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：他の核酸（合成DNA）

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★配列の種類：他の核酸（合成DNA）

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆配列の種類：他の核酸（合成DNA）

◆トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

◆

45
 Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys Arg
 1 5 10 15
 Phe Gly Ala Ala
 20

46

【0113】配列番号：16

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列：

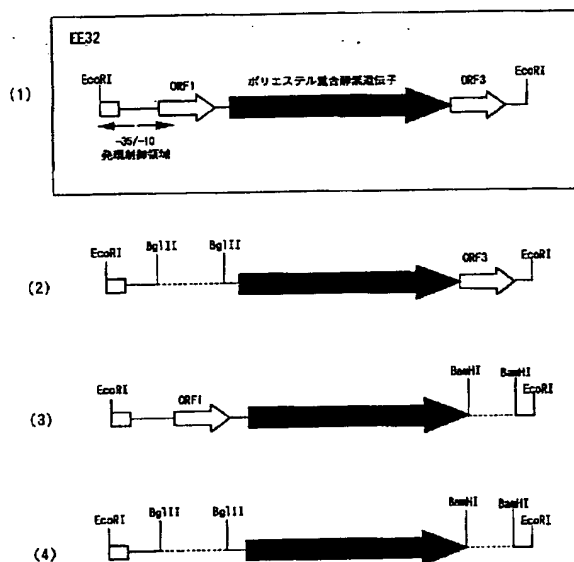
Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys
 1 5 10 15
 Arg Phe Gly Ala Ala
 20

【図面の簡単な説明】

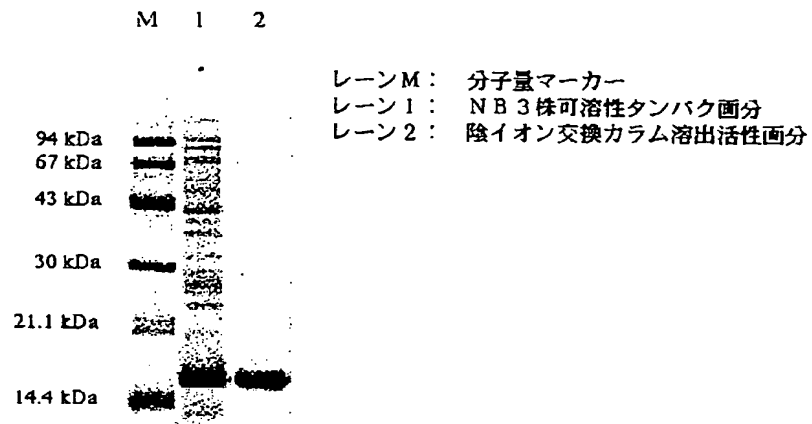
【図1】本発明の遺伝子の構築図である。

※【図2】SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F.I

//(C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:05)
 (C 1 2 N 9/88
 C 1 2 R 1:05)
 (C 1 2 P 7/62
 C 1 2 R 1:05)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)